

再生医療等製品の微生物学的評価

大分ラボラトリー 藤井 清治

国内における再生医療の臨床応用、再生医療等製品の研究開発推進の機運を受けて、有効性と安全性の確保を目的とした法的枠組みの整備が行われ、臨床研究や治験など研究開発が活発化し、同時に規制対応のための品質評価試験のニーズも高まっている。再生医療等製品の微生物学的試験においては、従来の測定手法に加え、試験期間短縮を目的とした迅速法の活用についても要求が高まっている。本稿では、ご好評いただいている当社の3試験法（無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験）の課題と当社取組み、新たに導入した無菌試験迅速測定法についても紹介する。

1 はじめに

再生医療等製品ではヒト由来の細胞・組織から得られる生きた細胞等を用いるため、その無菌性保証は医薬品の場合とは大きく異なる。特に最終滅菌法やろ過滅菌法での製品の無菌化ができないため、製造開始から出荷まで全工程を通して無菌操作を連続して実施する必要がある。

製造工程では作業による手作業での微生物汚染のリスクを最小化すると共に、製造環境、原材料、中間工程品（培養上清等）の微生物汚染リスクの管理が必要となる。

微生物汚染リスクには、一般細菌（好気性及び嫌気性）・真菌による汚染、グラム陰性桿菌から産生されるエンドトキシンによる汚染及び細胞に寄生するマイコプラズマによる汚染が想定され、それぞれを検出対象とした「無菌試験」、「エンドトキシン試験」及び「マイコプラズマ否定試験」が品質管理項目となる。本誌 SCAS NEWS 2016-II では「再生医療等製品の品質評価試験（特性解析・安全性評価試験）への取り組み」として事例を紹介した¹⁾。

本稿では、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験など、当社で実施している微生物学的試験の概要紹介に加え、無菌試験迅速測定法の導入に関して当社の取り組みを紹介する（表1参照）。

2 無菌試験

試験概要

再生医療等製品は一貫した無菌操作による製造工程を経て最終製品が製造され、無菌性保証のためには、製造工程のベリフィケーションに加え、工程管理及び出荷試験における無菌試験が求められる。

表1 微生物学的評価試験の一覧

試験項目	検査手法	備考
無菌試験	メンブランフィルター法 (MF 法)	ろ過可能検体（培養上清、低濃度細胞懸濁液等）
	直接法	細胞等のろ過困難検体
エンドトキシン試験	ゲル化法	限度試験
	光学法（比濁法、比色法）	定量試験
マイコプラズマ否定試験	A 培養法	液体培地、寒天培地培養
	B 指標細胞を用いた DNA 染色法	VERO 細胞表面培養
	C 核酸増幅法 (NAT) エンドポイント法 リアルタイム PCR 法	A 法、B 法の代替迅速法
NEW 無菌試験迅速測定	メンブランフィルター法 (MF 法)	ろ過可能検体（培養上清、低濃度細胞懸濁液等）
	表面塗抹法	細胞等のろ過困難検体

日本薬局方一般試験 無菌試験法（JP 無菌試験法）は2種の液体培地を使用し、一般細菌（好気性及び嫌気性）及び真菌を網羅的に検出する手法である²⁾。培地の濁りの有無を目視で判定する手法であるため、長期の培養期間（14日間以上）が必要とされる。そのため迅速測定法の活用による無菌試験結果の早期取得が求められている。

課題と対応

無菌試験法の実施環境においては、作業区域の適切な環境モニタリング及び適切な汚染防止措置の実施が要求されている。当社は環境モニタリング機能を有する無菌試験用アイソレータシステムを採用し、微生物コンタミネーションのリスク低減を図っている（図1参照）。

無菌試験法の設定に際して、供試試料量の決定が課題となる。JP 無菌試験法では抜き取り数量（供試個数）及び試料採取量の手順が規定されている。しかし、再生医療等製品の場合、1回の製造で得られる最終製品が少量であり規定の手順を適用できないため、可能な限り多くの供試試料量を確保するとともに、製造



図1 無菌試験用アイソレータシステム

工程に応じて妥当な供試試料量を決定する必要がある。

試料の接種手法としては、「メンブランフィルター法」又は「直接法」が用いられる（図2参照）。製造原料である培地や添加剤、あるいは培養上清などはメンブランフィルターでのろ過が可能であるため、大容量の試料が供試でき、より高い検出感度を得ることが出来る。また、メンブランフィルターに吸着した抗菌活性物質を洗浄ろ過により容易に除去できる利点もある。一方、最終製品については細胞懸濁液や細胞集合体であるために、メンブランフィルターの適用が困難な場合がある。この場合、試験用培地に検体を直接接種する「直接法」が有用である。しかしながら、「直接法」は抗菌活性物質の物理的な除去が出来ず、抗菌活性の中和には主に試験用培地の増量による希釈が想定されるが、その効果は限定的であることから手法の適合性試験により抗菌活性の有無を確認することが重要となる。

3 エンドトキシン試験

試験概要

エンドトキシンはグラム陰性桿菌に由来する発熱性物質であり、血中に入った場合、微量でも強い発熱を引き起こす。一旦、製品に混入したエンドトキシンは除去や不活化が困難であることから、最終製品のみでなく原料や工程管理におけるエンドトキシンの管理が必要である。

測定手法にはゲル化法及び光学法（比濁法、比色法）があり、いずれの手法を用いることも可能である。ゲル化法（限度試験）は出荷判定などにおいて規格値への適否を判定する場合に有用であり、光学法は定量結果を用いたトレンド管理が可能となる利点がある。



図2 メンブランフィルター法 (Steritest Equinox アイソフィットポンプ) - MERCK社ステリテストを用いたメンブランフィルター用ポンプ

又、試料に濁りがあり光学法の適用が困難な場合にはゲル化法の適用が検討される²⁾。

課題と対応

エンドトキシン試験はライセート試薬の酵素反応を利用した検出法である。試料に含まれる成分によっては酵素反応に影響を及ぼし、偽陽性などの反応干渉作用を起こす場合がある。再生医療等製品では培養液や細胞保存液等に含まれる種々の成分により反応干渉作用が現れる可能性が高く、試験法設定に際してはロット間差も考慮した条件設定が重要である。設定条件のうち試料の希釈倍数を決定する際には、より低希釈倍数での反応干渉因子試験の適合を確認した上で、ロット間差による影響を想定して、最大有効希釈倍数 (MVD) を超えない範囲で、より高希釈倍数を採用することも有用である。

4 マイコプラズマ否定試験

マイコプラズマ否定試験法は日本薬局方 (JP) 参考情報²⁾ に培養法 (A 法)、指標細胞を用いた DNA 染色法 (B 法)、核酸増幅法 (NAT) (C 法) の3つの手法が規定されている (表2参照)。

表2 マイコプラズマ否定試験の手法比較

検査手法	メリット	デメリット	
A 培養法	増殖可能なマイコプラズマを検出	培養期間が長期 (28 日間) 必要サンプルが多量: 約 21 mL	
B 指標細胞を用いた DNA 染色法	増殖可能なマイコプラズマを検出 VERO 細胞の利用により培養法よりも測定期間が短期間 必要サンプルが少量: 約 2 mL	培養期間が長期 (6 日間) 蛍光染色像の判定に習熟が必要 一部陽性対照の検出が困難	
C 核酸増幅法 (NAT)	エンドポイント法	測定期間が迅速: 約 1~2 日 必要サンプルが少量: 約 1 mL	死菌も検出 電気泳動バンドの目視確認 (操作が煩雑, コンタミリスク増)
	リアルタイム PCR 法	測定期間が迅速: 約 1~2 日 必要サンプルが少量: 約 1 mL 多穴プレートにより操作が簡便かつ多検体処理が可能	死菌も検出

A法は液体培地及び寒天培地を使用した培養法である。マイコプラズマのコロニーを特異的に検出することにより、増殖可能なマイコプラズマを検出できる利点があるが、培養に要する日数が28日間と長期間であるため、迅速性に欠ける欠点がある。

B法は指標細胞表面に感染したマイコプラズマのDNAの蛍光染色像を観察することにより、増殖可能なマイコプラズマを検出できる。VERO細胞表面に寄生して増殖することにより、A法よりも期間が短縮されるものの、培養に要する日数が6日間と長期間であるため、A法と同様に迅速性に欠ける欠点がある。又、マイコプラズマ以外のDNAも蛍光染色像として観察されるため、マイコプラズマのDNAの見極めに習熟が必要となる。

C法は測定の迅速性と高い検出感度の利点を活かし、A法およびB法の代替法とすることが可能である。再生医療等製品の評価では、試験の迅速性からC法が第一選択として考えられる。測定手法は、核酸増幅（PCR）産物のゲル電気泳動により得られたバンドの有無を確認するエンドポイント法と、リアルタイムPCRで得られた結果に基づいて判定を行うリアルタイムPCR法の2種類がある。リアルタイムPCR法は電子データ取得により

データの客観性に優れ、多検体処理も可能なことから、より有利な測定法である（図3参照）。

新たに試験法を設定する際は試料マトリクスの試験系への影響を評価する必要がある。JPの試験法には、DNAの抽出効率の評価が要求され、陽性対照として7菌種が規定されている。使用する試験菌は公的な頒布機関から入手可能であるが、菌液を調製するためには、菌種に応じた培養技術が必要とされる。当社では各菌種について複数の培養条件を検証し、至適培養条件を決定している（図4参照）。

C法において事前に考慮すべき点として、陽性判定の結果の取り扱いがあげられる。陽性判定によりマイコプラズマ由来のDNAの存在は明らかとなるが、由来となったマイコプラズマが増殖可能な状態であるか否か、つまり生菌か死菌かを判別することは不可能である。判別するためには培養手法のA法あるいはB法の実施が必要となる。これらは1週間～1ヵ月間の長期培養が必要であるため、C法の採用に先立ち、製造工程のベリフィケーションや試験法設定の予備試験を用いて、事前に死菌由来のDNA残分の有無を確認しておく必要がある。



図3 リアルタイムPCR外観 (ロシュ社Light Cycler 480)

5 無菌試験迅速測定法の確立

無菌試験迅速測定法の導入に関して当社の取り組みを紹介する。

JP参考情報 微生物迅速試験法ではATP法やPCR法など様々な手法の迅速測定法が列記されている。当社は再生医療等製品の無菌試験への適用に際して、以下の検討を行い、求められる要件の洗い出し及び手法の選定を行った²⁾。

再生医療等製品には、生きた細胞が含まれるため、増殖可能な微生物を特異的に検出するためには、生細胞の活性（ATP等）の検出原理の適用は困難と考えられた。微生物由来の遺伝子を抽出、増幅して検出するPCR法は、増殖能を失った微生物由来

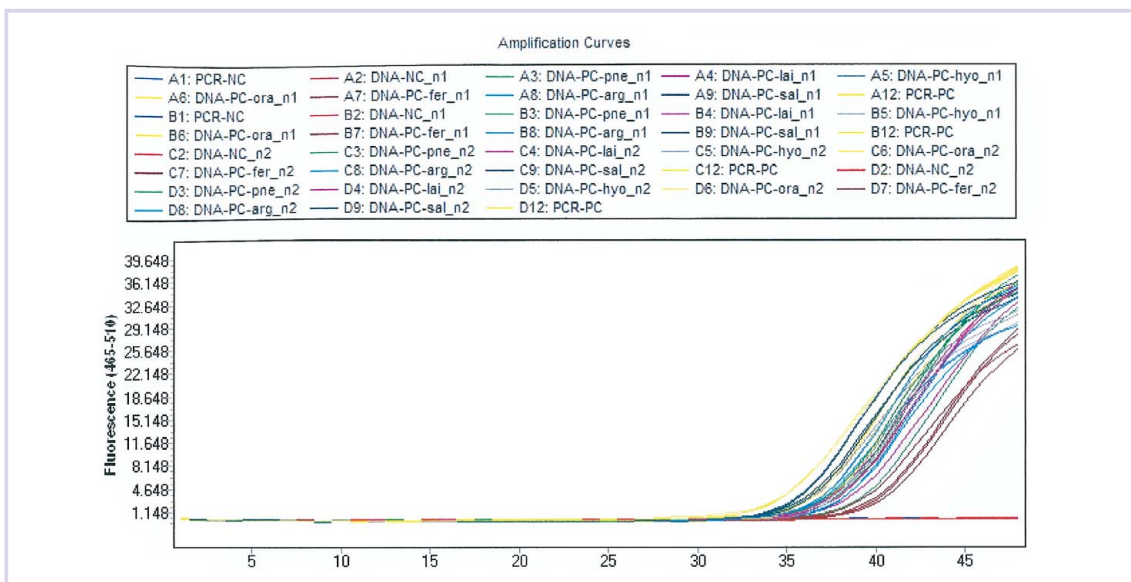


図4 リアルタイムPCRチャート (マイコプラズマ陽性対照)

のDNAを検出し偽陽性を検出するリスクがある。このことから、生細胞を含む検体から、増殖可能な微生物を特異的かつ網羅的に検出する手法を見出すことが課題と判断した。

こうした選定要件を踏まえ、寒天培地を利用したマイクロコロニー法が妥当であるとの結論に至った。マイクロコロニー法は従来法と同じ培養手法であるものの、増殖可能な微生物を特異的かつ網羅的に検出でき、高感度 CCD によるマイクロコロニーの検出により、従来の目視判定よりも迅速に検出され、かつデジタルデータによる客観的な結果を得ることができる(図5～7参照)。

マイクロコロニー法では検体の接種手法として、培地表面への直接接種の他、大容量の検体(培養工程中の培養上清等)を



図5 無菌試験迅速測定装置(マイクロバイオμ3D)

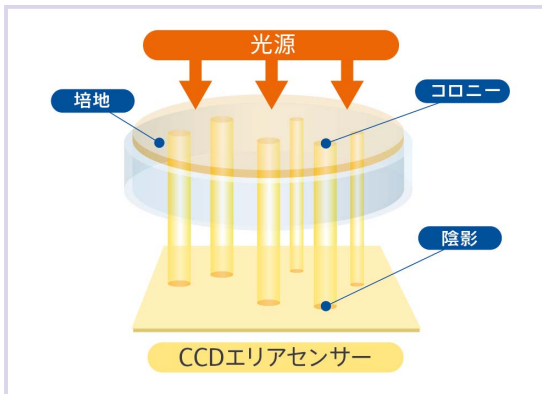


図6 測定原理(コロニー陰影をCCDで撮影)
日本BD社カタログから転載

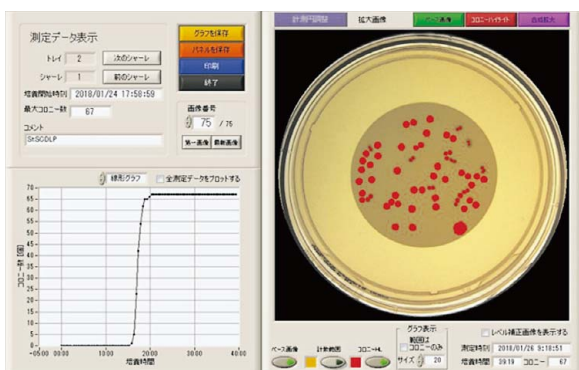


図7 測定画面(高感度に検出されたコロニーを連続モニタリング)

メンブランフィルターでろ過し、培地表面で培養することも可能となる。検出菌は、判定直後にコロニー形状で得られていることから、そのまま菌種の同定に供するか、短期間の単離培養で同定への移行が可能となる。

試験条件の検討では、まず培地の選定が重要である。培地の透過光を連続検知し、コロニー形成過程における陰影の変化を検出する測定原理であることから、透明性を有する培地が候補となった。複数種の培地を準備し、局方記載の試験菌6菌種を用いて、より迅速に検出される培地種及び培養温度を検討した。メンブランフィルターについても同様に、一定の光透過性を有する低吸着性の材質を選定することにより、抗菌活性物質による増殖阻害リスクを最小化した。

GMP 準拠での迅速法導入に際しては、JP 参考情報 微生物迅速試験法に記載された通り、試験法バリデーションの実施が要求されているが、具体的検証内容については、欧州薬局方、米国薬局方及び PDA テクニカルレポートを参考とした。当社では全ての評価基準を満たすべく、こうした公定法及びガイドライン³⁻⁵⁾を参照し、特異性、検出限界、頑健性、繰返し性、堅牢性及び同等性について評価を実施し、無菌試験迅速測定法の確立に至った。

確立した無菌試験迅速測定法は、再生医療等製品の無菌性評価においてその迅速性と応用範囲の広さから大いに活用されるものと考えている。

6 おわりに

当社では、再生医療等製品の微生物学的評価試験の各種試験を GMP 体制下で実施するとともに、無菌試験迅速測定法の導入事例のように、より広いニーズに応え、微生物学的評価試験を通して再生医療等製品の普及に貢献したいと考えている。

文献

- 1) 藤井清治, 泉川 健, 高橋昭博; SCAS NEWS 2016-II, **44**, 9 (2016) .
- 2) 第十七改正日本薬局方, available from < <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-lyakushokuhinkyoku/JP17.pdf> >, (accessed 2018-05-29) .
- 3) European Pharmacopoeia 9th –Chapter 5.1.6 Alternative Methods for Control of Microbiological Quality, available from < <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-9th-edition> >, (accessed 2018-05-29) .
- 4) United States Pharmacopeia (USP) chapter <1223>, Validation of Alternative Microbiological Methods. (Revised 2015) .
- 5) Parenteral Drug Association; Technical Report No. 33 (Revised 2013)



藤井 清治
(ふじい せいじ)
大分ラボトリー